

19 Japan Patent Office (JP)
 12 Kokai Patent Gazette (A)
 11 Document Number Hei 10-87621
 43 Publication Date April 7, 1998

 51 Int.Cl.⁶ Identification Number FI
 C07D 211/76 C07D 211/76
 223/10 223/10
 G01N 21/76 G01N 21/76

Request for Examination Not Requested
 Number of Claims 4 OL (5 Pages Total)

 21 Application Number Hei 8-242989
 22 Application Date September 13, 1996

 71 Applicant 000001856
 Sankyo, K.K.
 5-1-bango 3-chome Nihon Hashimoto-cho Chuo-ku Tokyo
 72 Inventor MAEDA Masako
 5-8-bango 1-chome Hata-no-Tsukasa Shinagawa-ku Tokyo
 within Showa Daigaku Yakugakubu
 74 Agent Attorney ONO Aki (and 2 others)

 54 [Title of the Invention] Enhancer for Lucigenin

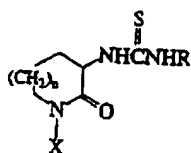
Chemiluminescence

57 [Abstract]

[Problem] The offering of an enhancer for lucigenin chemiluminescence with possibilities things such as immunoassays and DNA probe assays at high sensitivity.

[Solution Means] Thiourea derivatives which are shown by the formula

[Chemical 1]



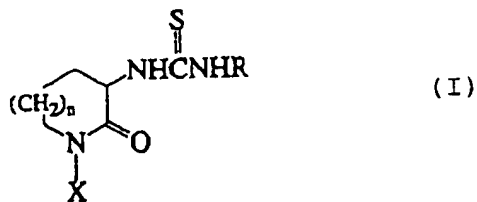
(In the formula, X represents a hydrogen atom or -CSNHR group and R represents a lower alkyl group, aryl group or aralkyl group) and the use of these as enhancers for lucigenin chemiluminescence and the performance of the detection of biological materials by lucigenin chemiluminescence in their presence.

/2

[Claims]

[Claim 1] Thiourea derivatives which are shown by (I)

[Chemical 1]



(in the formula, X represents a hydrogen atom or -CSNHR group, R represents a lower alkyl group, aryl group or aralkyl group and n represents 1 or 2).

[Claim 2] A thiourea derivative of Claim 1 wherein R represents a methyl group or ethyl group.

[Claim 3] Enhancers for chemiluminescence comprised of thiourea derivatives of Claim 1 or Claim 2 description.

[Claim 4] Methods which are characterized by luminescence in the presence of thiourea derivatives of Claim 1 or Claim 2 description for biological material detection methods for chemiluminescence using lucigenin.

[Detailed Explanation of the Invention]

[0001]

[Technological Field Associated with the Invention]

This invention pertains to thiourea derivatives which are used as enhancers for lucigenin chemiluminescence, their applications as enhancers for chemiluminescence and the detection of biological materials by chemiluminescence performed in their presence.

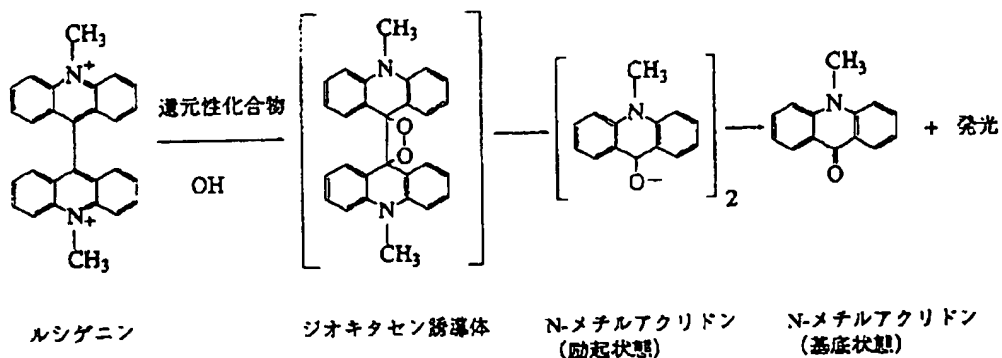
[0002]

[Prior Art] Lucigenin luminescence is widely used for the detection of biological materials in ones like immunoassays because biological materials can be detected rapidly and with high sensitivity. Previously, for the determination of lucigenin luminescence as in the following reaction formula, lucigenin, in the presence of alkali, reacts with hydrogen peroxide or reducing agents like ascorbic acid, dihydroxy acetone or glucose through

intermediates of peroxide and luminescent N-methyl acridone, and this is chemiluminescence is applied by the process of reverting from the excited state to the ground state.

[0003]

[Chemical 2]



[Key to Chemical 2]

- 1 reducing compound
- 2 + luminescence
- 3 lucigenin
- 4 dioctacin[?] derivative
- 5 N-methyl acridone
 (ground state)
- 6 N-methyl acridone
 (excited state)

[0004]

[Problems to be Solved by the Invention] This invention detects various materials with the enhancement of lucigenin luminescence and, in the presence of thiourea derivatives which are

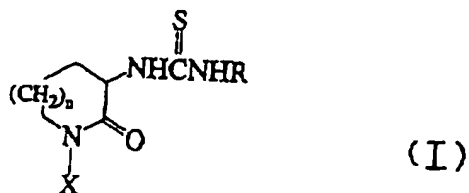
the following novel substances, the remarkable enhancement of lucigenin luminescence is developed by this invention.

[0005]

[Means for Solving the Problems] Lucigenin luminescence enhancers of this invention are, as in the following Formula (I),

[0006]

[Chemical 3]



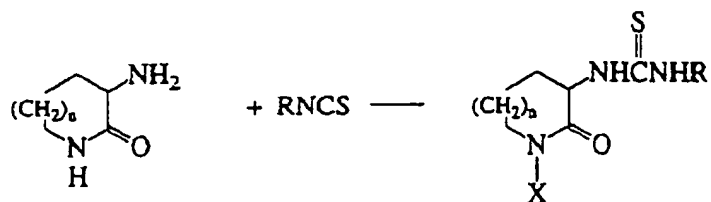
[0007] which represents thiourea derivatives (In the formula, X represents a hydrogen atom or -CSNHR GROUP, R represents a lower alkyl group, aryl group or aralkyl group and n represents 1 or 2).

[0008] In the above-mentioned Formula (I), alkyl groups represented by R include methyl, ethyl or propyl and compounds with R being methyl or ethyl show the greatest enhancement effect. Aryl groups include phenyl or 2-naphthyl groups and aralkyl groups include benzyl.

[0009] The thiourea derivatives of Formula (I), as shown in the following reaction formula, are manufactured by reactions of isothiocyanate (RNCS) with α -amino- ϵ -caprolactam or α -amino- δ -valerolactam.

[0010]

[Chemical 4]



/3

[0011] Thiourea derivatives of Formula (I) of this invention can extremely enhance lucigenin chemiluminescence as compared with cases performed in the presence of H₂O₂ or reducing agents.

[0012] Luminescence enhancement when adding 1 mmol/L of thiourea derivative (I) to a solution of 10⁻⁶M lucigenin is shown in Table 1. Also, the determination of luminescence intensity is indicated by the count during 10 seconds after standing for 15 seconds.

[0013]

[Table 1]

チオ尿素誘導体 (I)			発光強度
X	R	n	
H	CH ₃	2	6672
CSNHCH ₃	"	2	17700
"	"	1	17200

[Key to Table 1]

- 1 thiourea derivatives (I)
- 2 luminescence intensity

[0014] The values for the change in luminescence with the passage of time by the addition of thiourea derivatives (I) differ greatly after the addition of thiourea derivative addition; and, the times with greatly differing luminescence are shortened with increases in the concentration of thiourea derivatives as the rate somewhat decreases after that. The luminescence spectra for the addition of thiourea derivatives, also, is the same as when there is no addition and is shown at $\lambda_{max}=433$ and 473 nm, via N-methyl acridone, and the luminescent enhancement effect due to the addition of thiourea derivatives is considered to contribute to the promotion of luminescent reactions.

[0015] As shown in Figure 1, the compounds of Actual Example 1 showed a linear relationship between 12×10^{-11} ~ 12×10^{-6} when determined by the addition of dihydroxyacetone (DHA) or H₂O₂ as compared with the compounds of Actual Example 1 through step

dilutions of lucigenin concentration. The coefficient of variation at the respective points was 6.8-2.1%. The detection limit for this determination was 12 fmol (signal/noise=S/N ratio=3, n=5). This value was approximately 100 times higher sensitivity than luminescence using H₂O₂.

[0016] Methods which determine lucigenin chemiluminescence with the addition of thiourea derivatives (I) of this invention can be analytical methods like immunoassays and DNA probe assays, or the use of direct antigens of lucigenin and ones which label DNA which use lucigenin as the chemiluminescence agent.

[0017] In immunoassays, for antibodies which bond on microtitre plates, antigens of test subjects have antibody reactions and bond with avidin after the antibody with a biotin label for this is reacted, then, reacted with lucigenin containing biotin labeled liposomes. Lucigenin determination is carried out by lucigenin chemiluminescence methods of this invention for the bonded lucigenin containing biotin labeled liposomes. That is, the lucigenin containing liposomes are bonded by means of antigens in the solid phase in proportion to the antigen quantity present, thus the luminescence level increases according to the antigen concentration. The materials to be targeted include those like bio-synthetic IgG, hormones and vitamins, along with drugs, bacteria and viruses.

[0018] DNA probes, which chemically bond with biotin at the 5' end of oligonucleotides (20-50 bases) with complementary hybridization for the targeted gene, are prepared for DNA probe

assays; DNA that is determined is extracted from leukocytes in blood or live cells and adsorbed by microtitre plates. Then, the above-mentioned biotin labeled DNA probe specifically bonds through hybridization reactions. The DNA probe which is bonded on the plate, by means of avidin, is measured by the lucigenin chemiluminescence of this invention after reacting with the lucigenin containing biotin labeled liposomes. In this case, also, the luminescence increases along with increases of the targeted gene. As the targeted genes, there are ones like oncogenes, viral genes, bacterial genes and human genes.

[0019]

[Actual Examples]

[Actual Example 1]

Synthesis of α -(3-methylthioureido)- ϵ -caprolactam

12.8 g of DL- α -amino- ϵ -caprolactam (0.1 mole) are dissolved in 100 ml of methanol; then, 20 ml of methanol solution containing 8.8 g of methyl isothiocyanate (0.12 moles) is added while stirring at room temperature. After 5 minutes, white precipitate began to deposit and this was suction filter after 15 minutes, and successively washed with a small amount of methanol, approximately 50 ml of water, then a small amount of methanol. After drying, 18.5 g of the objective white deposit was obtained and recrystallized from ethanol. The recovered amount was 9.54 g (yield 47.4%), m.p. 156-157°C, UV $\lambda^{2-Profmax}$ nm:211(10.500), 241(10.100), IR:1655 cm⁻¹ (NHCO).

[0020] [Actual Example 2]

Measurement of Dehydroepiandrosterone (DHEA)-Sulfate

Determination of DHEA-sulfate was performed by the following methods by ion pair extraction methods. For the luminescent measurement apparatus,

/4

an Aroka Company [untranslatable: ruminessensuriida; probably a trade name: Luminescence Reader] BLR-301 was used. 100 μ l of lucigenin dissolved in 50 mmol/L sodium carbonate solution in a 1.5 ml capacity microtube, and 100 μ l of each of the respective concentrations of DHEA-sulfate was added; then, 200 μ l of 1, 2-dichloroethane was added and stirred. Next, this was separated by centrifuge for 1 minute and 100 μ l of the bottom layer was transferred to a test tube, then the solvent was [untranslatable; kisan; probably: dissipated] under a nitrogen gas flow. 1.5 ml of water was added to the residue and the residue dissolved. These solutions were used as controls, 10 μ l of the 10 mmol/L Actual example 1 Compound was added and the luminescence intensity was determined.

[0021] The quantitative determination was possible for within 1 μ mol/L to 1 mmol/L of DHEA-sulfate. The detection limit was 5 pmol (S/N ratio=2).

[0022] However, the detection limit when lucigenin was luminesced in the presence of H₂O₂ was 25 pmol. DHEA-sulfate could be determined with higher sensitivity than this by the addition of the compounds of Actual Example 1 of this invention.

[0023] [Actual Example 3]

Immunoassay

50 μ l of detection control samples and 100 μ l of anti-AFP monoclonal antibodies with biotin markers were added onto 96 vial microplates with anti- α -fetoprotein (AFP) monoclonal antibody in solid phase and were incubated overnight. After washing, 200 μ l of avidin and biotin labeled liposome mixture (1:1) was added and reacted for 30 minutes at 37°C.

[0024] After washing, 100 μ l of 250 mmol/L Na₂CO₃ and 10 μ l of the 10 mmol/L Actual Example 1 compound were added; after 15 seconds, the luminescence was measured for 10 seconds. The AFP concentration in the detection control sample was calculated from a calibration curve made from the luminescence intensity of AFP standards of known concentrations. [Untranslatable: maikurorumatto; LB96P (beruto-rudo); probably a trade name] was used for determination.

[0025] The detection limit was 0.01 ng/ml for the series with the addition of the Actual Example 1 compounds in the AFP determination series and the sensitivity was improved approximately 100 fold as compared with the those without the addition.

[0026] [Actual Example 4]

DNA Probe Assay

DNA extracted from leukocytes in blood were diluted with 100 mmol/L phosphate buffer solution, 100 μ l was added as the detection control sample, and overnight physisorption was done on 96 vial microplates. After washing the microplates, 100 μ l of DNA probe of biotin labeled DNA probes (in this case, vitamin D receptor, 300

bp) was added and hybridization reaction was done overnight at 65°C. After washing, 200 µl of avidin and lucigenin containing biotin labeled liposome solution (1:1) were added and reacted for 30 minutes at 37°C.

[0027] After washing, 100 µl of 250 mmol/L Na₂CO₃ and 10 µl of the 10 mmol/L Actual Example 1 compound were added and, after 15 seconds, luminescence was measured for 10 seconds. [Untranslatable: maikurorumatto LB96P (beruto-rudo); probably a trade name] was used for the measurement.

[0028] The sensitivity improved 100 fold for the detection of the series with the addition of the Actual Example 1 compound to the vitamin D receptor gene determination series compared to the series without the addition.

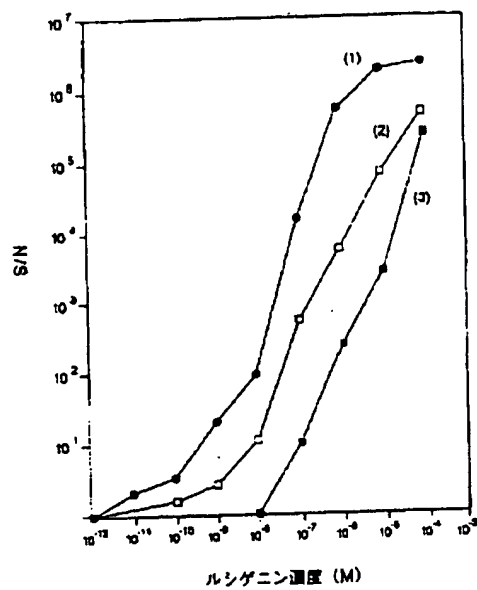
[Simple Explanation of the Figures]

[Figure 1] shows a working curve of luminescence enhancers for lucigenin chemiluminescence.

[Explanation of the Symbols]

- (1) α-(3-methylthioureido)-ε-caprolactam
- (2) dihydroxyacetone (DHA)
- (3) H₂O₂

[Figure 1]



[Key to Figure 1]

[horizontal axis] lucigenin concentration (M)

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 10087621 A

(43) Date of publication of application: 07 . 04 . 98

(51) Int. Cl. C07D211/76
C07D223/10
G01N 21/76

(21) Application number: 08242989

(22) Date of filing: 13 . 09 . 96

(71) Applicant: SANKYO CO LTD

(72) Inventor: MAEDA MASAKO

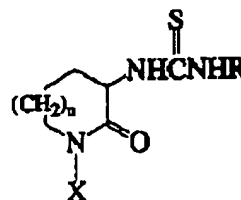
(54) ENHANCER FOR LUCIGENIN
CHEMILUMINESCENCE

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

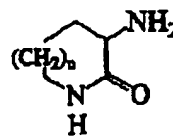
(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new thiourea derivative useful for enhancing the luminescence intensity of lucigenin.

SOLUTION: This enhancer is a thiourea derivative of formula I [X is H or of a group of the formula CSNHR (R is a lower alkyl, aryl or aralkyl); (n) is 1 or 2], e.g. α -(3-methylthioureido)- ϵ -caprolactam. The compound of formula I is obtained by reaction of isothiocyanate with α -amino- ϵ -caprolactam or α -amino- δ -valerolactam of formula II. This compound of formula I can be used for the detection of biological materials by making use of chemiluminescence using lucigenin; materials to be targeted include: hormones, vitamins, drugs, bacteria, virus, oncogenes, viral genes, bacterial genes, and human genes. By using this enhancer, chemiluminescence level rises according to antigen concentration; or, chemiluminescence increases as the quantity of a gene to be targeted increases.



I



II

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-87621

(43) 公開日 平成10年(1998) 4月7日

(51) Int.Cl.^a

識別記号

F I

C 0 7 D 211/76

C 0 7 D 211/76

223/10

223/10

G 0 1 N 21/76

G 0 1 N 21/76

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号

特願平8-242989

(22) 出願日

平成8年(1996) 9月13日

(71) 出願人 000001856

三共株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号

(72) 発明者 前田 昌子

東京都品川区旗の台1丁目5番8号 昭和

大学薬学部内

(74) 代理人 弁理士 大野 彰夫 (外2名)

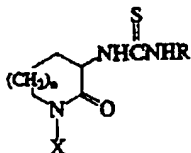
(54) 【発明の名称】 ルシゲニン化学発光の増強剤

(57) 【要約】

【課題】 ルシゲニン化学発光の増強剤を提供し、高感度でイムノアッセイやDNAプローブアッセイを可能にする。

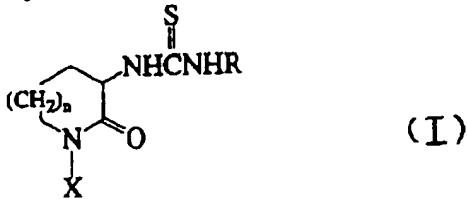
【解決手段】 式

【化1】



(式中、Xは水素原子又は-C SNHR基を表し、Rは低級アルキル基、アリール基又はアラルキル基を表す)で示されるチオ尿素誘導体、これをルシゲニン化学発光の増強剤として用い、その存在下にルシゲニン化学発光により生体物質の検出を行う。

【特許請求の範囲】
 【請求項1】 式(I)
 【化1】

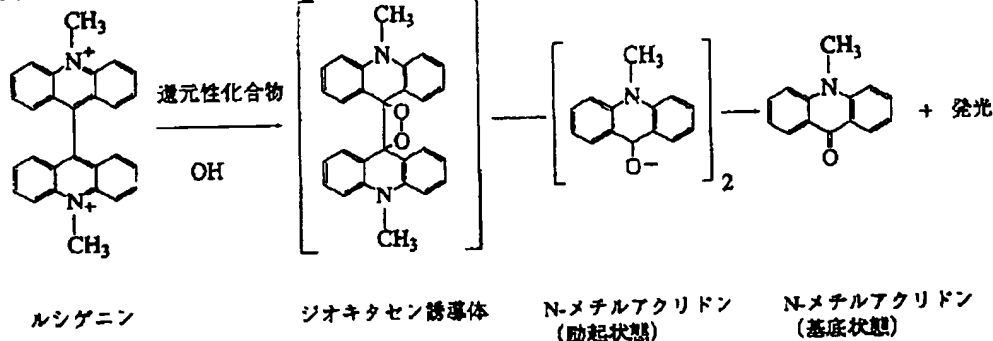


(式中、Xは水素原子又は-C₂H₅NHR基を表し、Rは低級アルキル基、アリール基又はアラルキル基を表し、nは1又は2を表す)で示されるチオ尿素誘導体。

【請求項2】 Rがメチル基又はエチル基である、請求項1記載のチオ尿素誘導体。

【請求項3】 請求項1又は2記載のチオ尿素誘導体からなるルシゲニン化学発光の増強剤。

【請求項4】 ルシゲニンをを用いる化学発光による生体物質の検出法において、請求項1又は2記載のチオ尿素誘導体の存在下に発光させることを特徴とする方法。*



【0004】

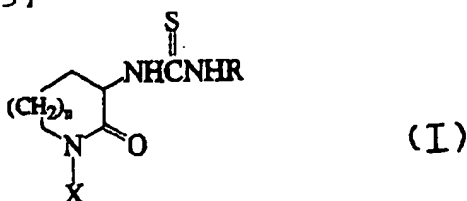
【発明が解決しようとする課題】本発明者は、ルシゲニンの発光強度を増強する各種物質を検討し、下記新規物質であるチオ尿素誘導体の存在下では、ルシゲニンの発光能を著しく増強することを見出し、本発明をなした。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明のルシゲニン発光の増強剤は、次式(I)

【0006】

【化3】



*【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ルシゲニン化学発光の増強剤として用いうるチオ尿素誘導体、その化学発光の増強剤としての用途及びその存在下で行う化学発光による生体物質の検出法に関する。

【0002】

【従来の技術】ルシゲニンの発光は、迅速かつ高感度で生体物質を検出することができるため、イムノアッセイ等の生体物質の検出に広く用いられている。従来ルシゲニン発光を測定するには、下記反応式に示すように、ルシゲニンがアルカリの存在下に、過酸化水素又はアスコルビン酸、ジヒドロキシアセトン、グルコースのような還元剤と反応し、ペルオキシドの中間体をへて、発光種であるN-メチルアクリドンを生成し、これが励起状態から基底状態に戻る過程での化学発光を利用している。

【0003】

【化2】

※【0007】(式中、Xは水素原子又は-C₂H₅NHR基を表し、Rは低級アルキル基、アリール基又はアラルキル基を表し、nは1又は2を表す)で示されるチオ尿素誘導体である。

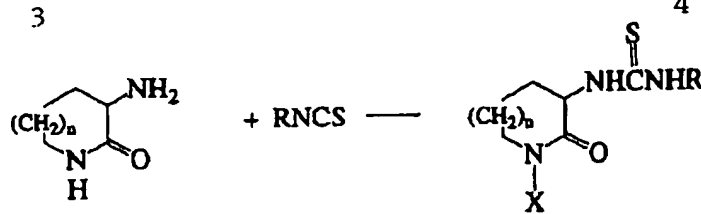
【0008】上記式(I)において、Rが示すアルキル基としては、メチル、エチルもしくはプロピルが挙げられ、Rがメチル又はエチルである化合物は最大の増強効果を示す。アリール基としては、フェニルもしくは2-ナフチル基が挙げられ、アラルキル基としては、ベンジルが挙げられる。

40

【0009】式(I)のチオ尿素誘導体は、次の反応式に示すように、α-アミノ-ε-カプロラクタム又はα-アミノ-δ-バレノラクタムにイソチオシアネート(RNCS)を反応させることにより製造される。

【0010】

※【化4】



【0011】本発明の式(1)のチオ尿素誘導体は、ルシゲニンによる化学発光を H_2O_2 又は還元剤の存在下に行う場合に比べて著しく増強することができる。

【0012】ルシゲニン $10^{-6}M$ の溶液にチオ尿素誘導体(1)を $1mmol/l$ 添加した場合の発光強度を表1に示す。なお、発光強度の測定は15秒間放置後の10秒間のカウントで示した。

【0013】

【表1】

チオ尿素誘導体 (I)			発光強度
X	R	n	
H	CH ₃	2	6672
CSNHCH ₃	〃	2	17700
〃	〃	1	17200

【0014】チオ尿素誘導体(1)の添加による発光経時変化は、チオ尿素誘導体添加後直ちに極大に達し、その後速やかに減少し、発光が極大に達する時間は、チオ尿素誘導体の濃度が高くなるにつれて短縮された。発光スペクトルはチオ尿素誘導体の添加においても、無添加の場合と同じく、 $\lambda_{max} = 433nm$ 及び $473nm$ を示し、N-メチルアクリドンを經由しており、チオ尿素誘導体の添加による発光増強効果は発光反応の促進に寄与しているものと考えられる。

【0015】図1に示すように、ルシゲニン濃度を段階希釈して、実施例1の化合物及び比較としてジヒドロキシアセトン(DHA)又は H_2O_2 を添加して測定したところ、実施例1の化合物は、 $1.2 \times 10^{-11} \sim 1.2 \times 10^{-6}M$ 発光強度との間に直線関係を示した。各点での変動係数は6.8~2.1%であった。この測定における検出限界は $12fmol$ ($signal/noise = S/N$ 比=3、 $n=5$)であった。この値は H_2O_2 を用いた発光より約100倍高密度であった。

【0016】本発明のチオ尿素誘導体(1)を添加するルシゲニンの化学発光を測定する方法は、ルシゲニンを化学発光剤として用いるイムノアッセイやDNAプローブアッセイ、あるいはルシゲニンを直接抗原やDNAに標識することによる分析方法も可能である。

【0017】イムノアッセイにおいては、マイクロタイタプレートに結合させた抗体に、測定対象の抗原を抗原抗体反応させ、これにビオチン標識した抗体を反応させた後、アビジンを結合させ、次いでルシゲニン含包ビオ

*チン標識リボソームを反応させる。結合したルシゲニン含包ビオチン標識リボソームは本発明のルシゲニン化学発光法によりルシゲニン測定を行う。すなわち抗原の存在量に比例してルシゲニン含包リボソームが固相上に抗体を介して結合するため、抗原濃度にしたがって発光量が増大することになる。測定対象物質としては、生体成分のIgG、ホルモン、ビタミン、更に薬物、細菌、ウイルスなどが挙げられる。

【0018】DNAプローブアッセイにおいては、測定対象遺伝子に相補的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド(20~50塩基)の5'末端にビオチンを化学的に結合させたDNAプローブを用意し、測定するDNAは生体の細胞あるいは血液中の白血球により抽出し、マイクロタイタプレートに吸着させる。次いで上記ビオチン標識DNAプローブをハイブリダイゼーション反応により特異的に結合させる。プレート上に結合したDNAプローブは、アビジンを介し、ルシゲニン含包ビオチン標識リボソームを反応させた後、本発明のルシゲニン化学発光により測定する。この場合も対象遺伝子の増加と共に発光は増大することになる。対象遺伝子としては、ガン遺伝子、ウイルス遺伝子、細菌の遺伝子やさらにヒトの遺伝子などがある。

【0019】

【実施例】

【実施例1】

α -(3-メチルチオウレイド)- ϵ -カプロラクタム
の合成

DL- α -アミノ- ϵ -カプロラクタム12.8g

(0.1mole)をメタノール100mlに溶かし、室温で
攪拌しながら、メチルイソチオシアネート8.8g

(0.12mole)を含むメタノール溶液20mlを加え

た。5分後に白色沈殿が析出しはじめ、15分攪拌後吸
引ろ取し、少量のメタノール、約50mlの水、そして少

量のメタノールで順次洗浄した。乾燥後目的の白色析出
物18.5gを得、エタノールから再結晶した。収量

9.54g(収率47.4%)、m.p.156~157°C、UV $\lambda^{2-}ProH_{max}$ nm:211(10.500)、

241(10.100)、IR:1655 cm^{-1} (NHC
O)。

【0020】【実施例2】

デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)-スルフェ
ートの測定

ルシゲニンとのイオン対抽出法によるDHEA-スルフェ
ートの測定を次の方法で行った。発光測定装置はアロ

カ社製ルミネッセンスリーダBLR-301を使用した。1.5ml容のマイクロチューブに50mmol/L炭酸ナトリウム溶液に溶解したルシゲニン100 μ lに、各種濃度のDHEA-スルフェート100 μ lを加え、1.2-ジクロロエタン200 μ lを加えて攪拌した。さらに1分間遠心分離し、下層100 μ lを試験管に移し、窒素ガス気流下で溶媒を揮散した。残渣に水1.5mlを加えて残渣を溶解した。その溶液を検体として、10mmol/Lの実施例1の化合物10 μ lを添加し、発光強度を測定した。

【0021】DHEA-スルフェート1 μ mol/Lから1mmol/Lの間で定量的に測定が可能であった。検出限界は5pmol (S/N比=2)であった。

【0022】一方、H₂O₂の存在下でルシゲニンを発光させた場合の検出限界は25pmolであった。これより本発明の実施例1の化合物を添加することによりDHEA-スルフェートを高感度に測定することができた。

【0023】[実施例3]

イムノアッセイ

抗 α フェトプロテイン(AFP)モノクローナル抗体を固相化した96ウェルマイクロプレートに、被検検体50 μ lとビオチン標識した抗AFPモノクローナル抗体100 μ lを添加し、一晩インキュベートした。洗浄後、200 μ lのアビジン及びルシゲニン含包のビオチン標識リボソーム混液(1:1)を加え、37℃で30分間反応させた。

【0024】洗浄後、250mmol/LNa₂CO₃100 μ l及び10mmol/L実施例1の化合物10 μ lを加え、15秒後から10秒間の発光を測定した。被検検体中のAFP濃度は、既知濃度のAFP標準品の発光強度から作成した校正曲線より算出した。測定にはマイクロロー

マットLB96P(ベルトールド)を用いた。

【0025】AFP測定系に実施例1の化合物を添加した系での検出限界は、0.01ng/mlであり、無添加の場合に比べて約100倍感度が上昇した。

【0026】[実施例4]

DNAプローブアッセイ

血液中の白血球より抽出したDNAを100mmol/Lリン酸緩衝液で希釈し、被検検体として100 μ lを加え、96ウェルのマイクロプレートに一晩物理吸着させた。マイクロプレートを洗浄後、ビオチン標識DNAプローブ(この場合ビタミンDレセプター、300bp)のDNAプローブ100 μ lを加え、65℃で一晩ハイブリダイゼーション反応させた。洗浄後、アビジン及びルシゲニン含包のビオチン標識リボソーム溶液(1:1)200 μ lを加え、37℃で30分間反応させた。

【0027】洗浄後、250mmol/LNa₂CO₃100 μ l及び10mmol/L実施例1の化合物10 μ lを加え、15秒後から10秒間の発光を測定した。測定にはマイクロローマットLB96P(ベルトールド)を用いた。

【0028】ビタミンDレセプター遺伝子測定系に実施例1の化合物を添加した系での検出は、無添加の場合に比べて100倍感度が上昇した。

【図面の簡単な説明】

【図1】ルシゲニン化学発光における発光増強剤の検量線を示す。

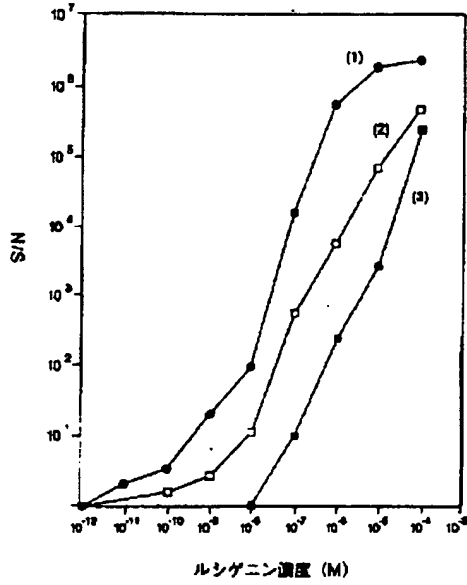
【符号の説明】

(1) α -(3-メチルチオウレイド)- ϵ -カプロラクタム

(2) ジヒドロキシアセトン(DHA)

(3) H₂O₂

【図1】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.